

J. Rakuno Gakuen Univ., 25 (2) : 293~297 (2001)

希釈して調製した緑汁発酵液添加がアルファルファサイレージの 発酵品質におよぼす影響

野 英 二・泉 賢 一・永 井 志 奈・小 田 恵美子

Previously Fermented Juice Studied as an Additive for Its Effect on Fermentation Quality of Alfalfa Silage

Eiji NO, Kenichi IZUMI, Shina NAGAI and Mieko ODA
(August 2000)

緒 言

良質サイレージの調製は好気性微生物と有害嫌気性菌を抑制することである。これらはサイロ内の嫌気性の保持，材料の水分調整（予乾）および添加剤の効率的利用で達成できる。

添加物に関して，わが国では，蟻酸，乳酸菌製剤，乳酸菌製剤と酵素製剤の混合物などが多く利用されている。乳酸発酵を促進する乳酸菌製剤の効果は，材料の糖含量などに影響されやすく，また，改善効果を示さないものもある^{1,6)}。大島ら^{7,8)}は，牧草の搾汁液（緑汁液）を嫌氣的発酵させた緑汁発酵液添加がサイレージの品質改善に効果があることを認めた。さらに，緑汁発酵液は乳酸菌製剤に匹敵する効果をも認められている²⁾。これは牧草表面に付着している乳酸菌群が増殖され，乳酸発酵のスターターとしての有効性を示すものである。

緑汁発酵液の作成は極めて容易であるが，実用規模での添加剤としての利用には省力的な多量生産が望まれる。その方法として，緑汁液あるいは緑汁発酵液を希釈して調製することが考えられる。そこで本実験では，緑汁発酵液の生産を実用化レベルに近づけるため，希釈して調製した緑汁発酵液がアルファルファサイレージの発酵品質に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

1. 添加液の調製

アルファルファ生草 50 g に水 250 ml を加えミキサーで磨砕攪拌し，2 重ガーゼで濾過した緑汁液を基に，緑汁液を発酵した液 (PFJ)，緑汁液を 20 倍希釈して発酵した液 (dPFJ)，PFJ を 20 倍希釈して発

酵した液 (PFJ 20) および dPFJ を 20 倍希釈して発酵した液 (dPFJ 20) を調製した。また，市販の乳酸菌製剤 (*L.case*) を添加用に調整した液 (LAB)，LAB を 20 倍に希釈して発酵させたものをさらに 20 倍に希釈して発酵した液 (LAB 20×20) を調製した。各発酵液はいずれもグルコースを 2 % 添加した後，2 日間 30℃ で嫌氣的発酵して調製した（表 1）。

2. サイレージ調製

サイレージの材料草には，無予乾および予乾のアルファルファ 1 番草（開花初期）を用いた（表 2）。無添加区，PFJ，dPFJ，PFJ 20，dPFJ 20，LAB および LAB 20×20 添加区を設け，サイレージを調製した。サイロには 2 重ポリ容器を用い，2 ヶ月間貯蔵した。

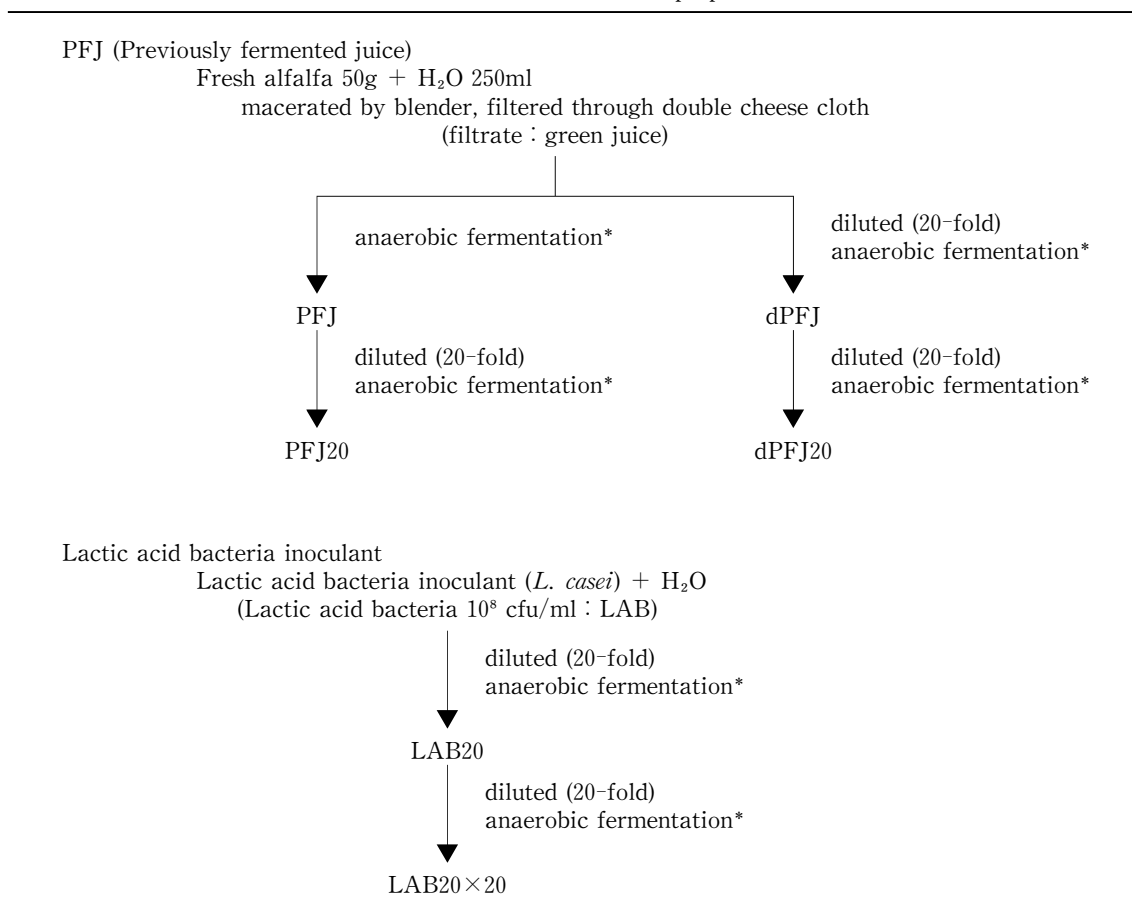
緑汁発酵液はいずれも新鮮材料に対して 0.2%，乳酸菌製剤液は 0.1% 添加した。

3. 分析方法

添加剤の総乳酸菌および好気性細菌数は，それぞれ BCP 加プレートカウント培地および標準寒天培地を用い混釈平板法により計測した。

材料草は 60℃ で通風乾燥後 1 mm 以下に粉碎し，水分，粗蛋白質 (CP)，中性デタージェント繊維 (NDF)，酸性デタージェント繊維 (ADF) 含量は常法⁵⁾で，可溶性炭水化物 (WSC) 含量はアンスロン法⁵⁾にて測定した。

サイレージの化学組成 (水分，CP，NDF，ADF) は材料草と同じ方法で測定した。pH はイオンメーター，乳酸と揮発性脂肪酸はガスクロマトグラフィー，揮発性塩基態窒素 (VBN) は水蒸気蒸留法⁵⁾で分析，定量した。

Table 1 Method of additives preparation.

*: Adding 2 g/100 ml glucose, incubated anaerobically at 30 °C for 2 days.

Table 2 Chemical composition of alfalfa material before ensiling.

Material	Moisture (%)	CP	NDF	ADF	WSC
		——	(DM%)	——	
Unwilted	79.2	17.6	46.6	36.2	6.7
Wilted	64.9	19.6	44.1	35.0	6.8

結 果

各添加剤の総乳酸菌と好気性細菌数を表3に示した。各緑汁発酵液の総乳酸菌数は、10⁶~10⁷ 個/mlであったが、LAB 20×20には検出されなかった。dPFJ 20 と LAB 20×20 の好気性細菌数は他のものより多かった。

サイレージの発酵品質を表4に示した。無予乾草ではPFJ, dPFJ および PFJ 20 添加区で乳酸含量の増加と pH の低下が認められた。酢酸含量はいずれも低い値であった。酪酸含量は pH の低かった PFJ, dPFJ, PFJ 20 添加区が他ものに比べて有意に低く (p<0.05), それ以外の添加サイレージは無添

Table 3 Lactic acid and aerobic bacteria count in additives.

Treatment	Bacteria (cfu/ml)	
	lactic acid	aerobic
PFJ	2.9×10 ⁷	2.4×10 ²
dPFJ	5.0×10 ⁷	0
PFJ20	6.2×10 ⁷	1.0×10 ³
dPFJ20	5.0×10 ⁶	4.1×10 ⁶
LAB	7.8×10 ⁷	1.0×10 ¹
LAB20×20	0	1.9×10 ⁶

Table 4 Fermentative quality of alfalfa silage.

Treatment	pH	Acids (%FM)				VBN (%TN)	V-score
		Lactic	Acetic	Butyric	Total		
Unwilted silage							
Control	5.64 ^A	0.00 ^B	0.46 ^a	0.56 ^A	1.07 ^b	29.4 ^A	8.0 ^B
PFJ	4.66 ^{BC}	0.99 ^{Ab}	0.46	0.01 ^B	1.46 ^a	10.8 ^{Bc}	83.7 ^{Ab}
dPFJ	4.73 ^B	1.11 ^A	0.46 ^a	0.00 ^B	1.57 ^{Aa}	10.6 ^B	84.6 ^{Ab}
PFJ20	4.56 ^C	1.35 ^{Aa}	0.37	0.00 ^B	1.71 ^{Aa}	7.0 ^{Bd}	94.7 ^{Aa}
dPFJ20	5.71 ^A	0.00 ^B	0.18 ^b	0.58 ^A	0.80 ^{Bb}	30.8 ^{Aa}	9.5 ^B
LAB	5.73 ^A	0.00 ^B	0.44	0.61 ^A	1.08 ^b	28.2 ^A	8.2 ^B
LAB20×20	5.73 ^A	0.00 ^B	0.42	0.53 ^A	1.01 ^{Bb}	26.4 ^{Ab}	8.3 ^B
Wilted silage							
Control	4.79 ^{ABa}	1.58	0.49 ^{Bc}	0.07 ^B	2.13 ^b	8.2 ^{ABa}	51.3 ^C
PFJ	4.72 ^{Bb}	1.40	0.74 ^{ABb}	0.00 ^C	2.15	8.6 ^A	88.7 ^{ABbc}
dPFJ	4.81 ^{ABa}	2.30	1.00 ^{Aa}	0.01 ^C	3.32 ^a	8.6 ^A	85.2 ^{Bc}
PFJ20	4.56 ^C	2.05	0.40 ^C	0.01 ^C	2.47	6.8 ^{Bb}	93.3 ^{ABab}
dPFJ20	4.60 ^C	2.13	0.58 ^{BC}	0.00 ^C	2.72	7.6 ^{AB}	91.1 ^{ABb}
LAB	4.44 ^D	1.75	0.38 ^C	0.02 ^C	2.15 ^b	4.1 ^C	96.8 ^{Aa}
LAB20×20	4.85 ^A	1.61	0.57 ^{BC}	0.12 ^A	2.30	7.9 ^{AB}	48.0 ^C

A, B, C, D, E: $p < 0.01$, a, b, c, d: $p < 0.05$

加区と差がなかった。全窒素に対するアンモニア態窒素の割合（VBN 比）についても PFJ, dPFJ, PFJ 20 添加区が有意に低く ($p < 0.01$), V-スコアは有意に高かった ($p < 0.01$)。他の添加サイレージの VBN 比と V-スコアは無添加区と差がなかった。

予乾サイレージの pH は LAB 区が最も低かった ($p < 0.01$)。乳酸含量は無予乾サイレージで低い傾向にあったが、処理間に有意な差は認められなかった。酢酸含量は PFJ, dPFJ 添加区が高かった ($p <$

0.01)。酪酸含量は無添加, LAB 20×20 添加区が高かった。VBN 比は, LAB 区が有意に低く ($p < 0.01$), 他は無添加区と差がなかった。V-スコアは LAB 区が最も高く, 無添加および LAB 20×20 添加区が有意に低かった ($p < 0.01$)。

サイレージの化学組成と乾物回収率を表 5 に示した。無予乾草の無添加, dPFJ 20, LAB および LAB 20×20 添加区の NDF と ADF 含量は, PFJ, dPFJ および PFJ 20 添加区より有意に高く, 乾物回収率は低かった ($p < 0.01$)。

Table 5 Chemical composition and dry matter recovery of alfalfa silage.

Treatment	Moisture (%)	CP	NDF (DM%)	ADF	Recovery (%)
Unwilted silage					
Control	83.3 ^{Aa}	16.4 ^{Cc}	55.5 ^A	45.4 ^A	97.6 ^{Bb}
PFJ	81.1 ^C	19.7 ^A	47.5 ^D	37.6 ^C	99.2 ^A
dPFJ	80.9 ^C	19.3 ^A	46.5 ^D	37.8 ^C	99.1 ^A
PFJ20	80.8 ^C	19.8 ^A	47.0 ^D	37.4 ^C	99.3 ^A
dPFJ20	82.9 ^{ABb}	17.9 ^{Ba}	52.9 ^B	42.0 ^{Bb}	98.0 ^{Ba}
LAB	82.7 ^{Bc}	17.5 ^{BCb}	53.5 ^B	43.2 ^{Ba}	97.8 ^B
LAB20×20	83.2 ^{ABab}	18.1 ^B	53.8 ^{BC}	43.8 ^{Ba}	97.6 ^{Bb}
Wilted silage					
Control	67.0	19.8 ^{Bb}	46.8 ^{bc}	38.9	98.8 ^B
PFJ	67.5	20.0 ^A	47.1 ^{abc}	38.4	98.8 ^B
dPFJ	67.2	19.7 ^{Bb}	47.8 ^{ab}	39.3 ^a	98.8 ^B
PFJ20	67.4	20.1 ^b	46.5 ^c	37.7 ^{Bb}	99.3 ^{Aa}
dPFJ20	67.2	20.4 ^{Aa}	46.2 ^{bc}	37.3 ^{Bb}	99.2 ^{Ab}
LAB	66.8	20.2 ^A	45.9 ^{Bb}	37.8 ^b	99.2 ^A
LAB20×20	67.1	19.3 ^{Bc}	48.3 ^{Aa}	40.1 ^{Aa}	98.8 ^B

A, B, C: $p < 0.01$, a, b, c: $p < 0.05$

予乾サイレージの NDF 含量は LAB 区が低かったが、処理間の差は無予乾サイレージより小さかった。乾物回収率は有意な差を示したが、いずれも高い値であった。

考 察

本実験に用いた無予乾の材料草は高水分 (79.2%)、低 WSC 含量 (6.7%) であり、サイレージ用材料草としては適切なものではなかった。その結果、無添加の発酵品質は、乳酸が認められず、酪酸含量および VBN 比が高かった。また、VFA 組成および VBN 比より算出される V-スコア³⁾は低く、極めて低品質であった。

乳酸発酵を促進し、不良微生物を抑制するためには、材料 1 g 当たり 10^5 個以上の乳酸菌が必要であり、乳酸菌製剤を添加剤として利用する場合は材料 1 g 当たり $10^5 \sim 10^6$ の菌数になるように添加することが必要である¹⁾。緑汁発酵液の添加された乳酸菌数 (材料草 1 g 当たり) は、PFJ, dPFJ および PFJ 20 添加区がほぼ 10^5 個、dPFJ 20 添加区が 10^4 個であった。この添加菌数がサイレージの発酵品質に影響したものと判断できる。つまり、基準量が添加された PFJ, dPFJ および PFJ 20 添加区の発酵品質は顕著に改善されたが、dPFJ 20 添加区には効果が示されなかった。

LAB の乳酸菌添加量は PFJ より多かったにもかかわらず、発酵品質は低質であった。サイレージ発酵における主となる乳酸菌は桿菌であるが、球菌は発酵初期において好気性菌抑制の先駆的役割をなす重要な菌である⁴⁾。つまり、LAB に含まれる乳酸菌は *L.casei* 単種であり、緑汁発酵液は複数の乳酸菌群を含んでいることが予測され、サイレージ発酵に影響したことが推察される。

予乾草の無添加、dPFJ 20, LAB および LAB 20×20 添加区の発酵品質は無予乾のものより品質が良好であった。とりわけ dPFJ 20 と LAB 添加は顕著に品質が改善された。材料草の予乾による有害嫌気性菌の抑制と乳酸菌添加による相乗効果が顕著に示された。さらに、予乾草に対する乳酸菌の添加は、単種あるいは一般に認められている基準量よりやや少ない場合でも効果的であることを示唆するものであった。

サイレージ品質と成分組成および乾物回収率の関係では、低品質のものほど繊維成分割合が高くなり、乾物回収率が低くなる傾向が示された。このことは、高品質サイレージは乳牛に対する有効エネルギーのロスが少ないことを再確認されたものと判断できる。

以上から、緑汁液あるいは発酵液を 20 倍に希釈発酵した緑汁発酵液は、サイレージの発酵品質を顕著に改善し、その効果は乳酸菌製剤以上であった。しかし、希釈発酵した液をさらに希釈発酵したものは、その添加効果が低下することを示した。また、今回の実験では、希釈発酵を重ねることにより乳酸菌が優先的に維持されることが期待されたが、PFJ 20 や dPFJ 20 のように希釈発酵を繰り返すことにより、緑汁発酵液中の好気性細菌が増加する傾向にあった。さらに、LAB 20×20 においては乳酸菌が検出されず、好気性細菌が顕著に増加した。これらのことは、嫌氣的発酵の時間、温度、グルコースの添加量などが影響していることも予想され、今後、発酵液の調製条件の検討が必要と思われる。

要 約

材料草に無予乾および予乾のアルファルファ 1 番草を用い、緑汁液およびその発酵液を希釈して調製した緑汁発酵液の添加がサイレージの発酵品質に及ぼす影響を検討した。サイレージは①無添加、②緑汁液を発酵した液 (PFJ)、③緑汁液を 20 倍希釈して発酵した液 (dPFJ)、④ PFJ を 20 倍希釈して発酵した液 (PFJ 20)、⑤ dPFJ を 20 倍希釈して発酵した液 (dPFJ 20)、⑥乳酸菌製剤を添加用に調製したもの (LAB)、⑦ LAB を 20 倍に希釈して発酵させたものをさらに 20 倍に希釈して発酵した液 (LAB 20×20) 添加の 7 処理区とした。結果は以下の通りである。

- 1) 全ての緑汁発酵液の総乳酸菌数は $10^6 \sim 10^7$ 個/ml であり、LAB とほぼ同数であった。
- 2) 無予乾草の PFJ, dPFJ, PFJ 20 添加区は乳酸含量の増加、pH と VBN 比の低下を示した。
- 3) 予乾草における緑汁発酵液添加区はいずれもサイレージの品質改善を示した。

以上から、無予乾草の dPFJ 20 を除く緑汁発酵液の添加は顕著にアルファルファサイレージの品質を改善した。

謝 辞

添加剤の微生物検索にご協力下さいました本学食品科学科菊地政則教授に感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 安宅一夫, 1986. サイレージバイブル (高野信雄・安宅一夫監修), pp 84-85, 酪農学園出版部, 江別。
- 2) 安宅一夫, 野 英二, 1998. 地域特性に基づく

- 添加物処理による品質改善に関する研究（研究課題番号 07306013），平成 7 ～ 9 年度科研費補助研究成果報告書，pp 133-152.
- 3) 自給飼料品質評価研究会編，1994. 粗飼料の品質評価ガイドブック，pp 82-87，日本草地協会，東京.
- 4) 菊地政則，1986. サイレージバイブル（高野信雄・安宅一夫監修），pp 25-37，酪農学園出版部，江別.
- 5) 森本 宏 監修，1971. 動物栄養試験法，養賢堂，東京.
- 6) 野 英二，種田三郎，井上錦次，1991. 牧草サイレージの発酵品質に対する乳酸菌製剤の添加効果，日草誌（別号）；37：213-214.
- 7) Ohshima, M., Y. Ohshima, E. Kimura and H. Yokota, 1997. Fermentation quality of alfalfa and Italian ryegrass silages treated with previously fermented juices prepared from both the herbages. Anim. Sci. Technol., 68: 41-44.
- 8) Ohshima, M., E. Kimura and H. Yokota, 1997. A method of making good quality silage from direct cut alfalfa by spraying previously fermented juice. Anim. Sci. Technol., 66: 129-137.

Summary

This study was conducted to clarify the effects of previously fermented juice on the fermentative quality of alfalfa silage. Alfalfa green juice was prepared in two batches, namely, full-strength and juice diluted 20-fold; and both batches were allowed to ferment. Then from 1st-cut unwilted and wilted alfalfa, silage was made by seven different treatment variations: (1) nothing added (control); (2) addition of previously fermented juice prepared from the full-strength batch (PFJ); (3) addition of fermented juice prepared from the diluted bath (dPFJ); (4) addition of PFJ that was diluted 20-fold (PFJ20); (5) addition of dPFJ that was diluted 20-fold (dPFJ20); (6) inoculant of lactic acid bacteria, i.e., *L. casei* (LAB); and (7) addition of a 20-fold-diluted solution derived from anaerobically fermented LAB that had been diluted 20-fold (LAB20×20).

The following results were obtained:

- 1) The viable number of lactic acid bacteria was 10^6 - 10^7 cfu/ml in previously fermented alfalfa juice, and 10^7 cfu/ml in LAB.
- 2) Unwilted silage treated with PFJ, dPFJ, and PFJ20 (treatments 2,3, and 4 described above) had large amounts of lactic acid, but the pH and volatile basic nitrogen (VBN) were low.
- 3) Wilted silages treated with all previously fermented alfalfa juice had good fermentation quality.

These results indicate that previously fermented alfalfa green juice, either full-strength or diluted, enhances the fermentation quality of alfalfa silage.